Aus dem Institut für Toxikologie der Universität Tübingen
Ehem. Direktor: Em. Professor Dr. med. P. Pulewka

Der Stoffwechsel von Levomepromazin bei Ratte und Mensch

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Jürgen-Rüdiger Petzel
aus Cumlosen/West-Prignitz

1969

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543901_0006

Aus dem Institut für Toxikologie der Universität Tübingen
Ehem. Direktor: Em. Professor Dr. med. P. Pulewka

Der Stoffwechsel von Levomepromazin bei Ratte und Mensch

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Jürgen-Rüdiger Petzel
aus Cumlosen/West-Prignitz

1969

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Prof. Dr. J. Hirschmann

Berichterstatter: Prof. Dr. P. Pulewka

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v. Spangenberg KG · Tübingen

Meinen Eltern gewidmet

Vorbemerkung

Herrn Professor Dr. Paul Pulewka möchte ich herzlich Dank sagen, daß er mir, indem er mir diese Arbeit am Tübinger Institut für Toxikologie ermöglichte, Gelegenheit gab, aktuelle Fragen und moderne Arbeitsmethoden aus dem Bereich der Toxikologie näher kennenzulernen.

Herrn Dipl.-Chemiker Dr. Hans Eberhardt danke ich vielmals für die Anleitung bei den Versuchen und die Unterstützung bei der Auswertung der UV-Spektrogramme.

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

I Einleitung und Problemstellung

1. Allgemeines Verhalten der Pharmaka im Organismus 1
2. Allgemeinbetrachtung der Phenothiazine 2
3. Problemstellung 3
4. Untersuchungsmaterial 4

II Untersuchung von Rattenharn

1. Untersuchungsgang 5
   A: Extraktion 6
      a. Saure Chloroformextraktion 6
      b. Saure Hydrolyse und Essigesterextraktion 7
   B: Dünnschichtchromatographie 9
      a. Fließmittel 10
      b. Sprühreagenzien
         1. Denkbare Metabolisierungsorte ($M_{1-2-3-4}$) und funktionelle Gruppen nach dem Stand der Forschung 12
         2. Spezifische Sprühreagenzien zum Nachweis der funktionellen Gruppen 16
   C: UV-Spektren 17
2. Anfertigung eines Metabolitenbildes ("Standardmetabolitenbild") 18
3. Identifizierung der Metaboliten anhand von:
   A: Sprühreagenzien 20
      a. Allgemeine Untersuchungen 20

Seite

b. Farbreaktionen der einzelnen Metaboliten 22
c. Tabellarische Zusammenfassung der Farbreaktionen 30
B: Vergleichssubstanzen 32
C: UV-Spektren 34
a. UV-Spektren von Vergleichssubstanzen .....
b. UV-Spektren der einzelnen Metaboliten 35
4. Zusammenfassung der Ergebnisse
a. Funktionelle Gruppen an den Metabolisierungsorten M_1 - M_4 40
b. Metabolitenstruktur 44

III Vergleichende Untersuchungen von Patientenharn 45
1. Leerharnextrakt .....
2. Levomepromazin-Harnextrakt .....

IV Tabellarischer Vergleich der aus den Ratten- und Menschenharnextrakten erhaltenen Metabolitenbilder 47

V Zusammenfassung 49

VI Literaturverzeichnis 51

I Einleitung und Problemstellung

1. Allgemeines Verhalten der Pharmaka im Organismus.

Aus dem Darm resorbierte lipoidlösliche Pharmaka gelangen über die Lymphbahnen und den Blutkreislauf zu den parenchymatösen Organen, wo sie gespeichert (z.B. Gehirn; Unterhautfettgewebe) oder abgebaut (metabolisiert) werden. Hauptort der Metabolisierung ist die Leber. Hier werden die ursprünglich lipoidlöslichen Pharmaka metabolisiert und, z.B. durch Konjungation mit Glucuronsäure - in geringem Maße auch mit Schwefelsäure - zu wasserlöslichen Metaboliten umgebaut, die nunmehr nach Nierenpassage mit dem Urin oder im Gallensekret über den Darm mit den Faeces ausgeschieden werden können. Die Menge der mit den Faeces ausgeschiedenen Glucuronide ist wesentlich geringer als die mit dem Urin ausgeschiedene Menge, da ein großer Teil durch Glucuronidaseeinwirkung im Darm gespalten und erneut resorbiert wird. Die nachfolgende Skizze zeigt diesen Kreislauf schematisiert.

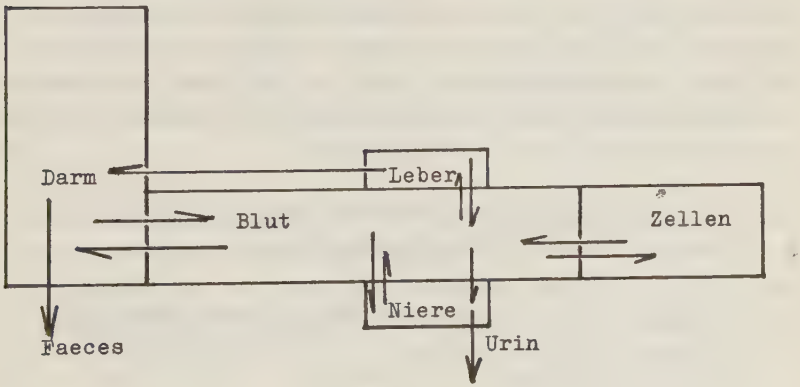


Abb. 1

2. Allgemeinbetrachtung der Phenothiazine.

Die Grundstruktur der Phenothiazine ist ein dreikerniges Ringsystem mit einem Schwefel- und einem Stickstoffatom als Heteroatome im mittleren Sechsring. Diese Verbindung war bereits im auslaufenden 19. Jahrhundert bekannt und fand besonders als Insekticid und als Anthelminticum Verwendung. Weitaus größere Therapeutische Bedeutung kommt den N-Aminoalkylderivaten des Phenothiazins zu.

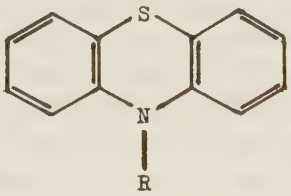


Abb. 2

Ursprünglich in die Therapie als Antihistaminika eingeführt, wurden die Phenothiazine - besonders in Frankreich - einer systematischen Forschung unterworfen, so daß ihnen bald ein breites Indikationsfeld erschlossen werden konnte. So finden sie beispielsweise reichlich Verwendung als Analgetica, Sedativa, Neuroplegica, bei den heutigen Narkoseverfahren, sowie bei der sog. pharmakologischen Hibernisation ("künstlicher Winterschlaf") und in zunehmendem Maße als Tranquillizer.

Als "Nebenerscheinung" sei bei der Phenothiazin-Medikation auf die starke Blutdrucksenkung und damit erhöhte Kollapsbereitschaft hingewiesen. Auch sei in diesem Zusammenhang die potenzierende Wirkung auf andere Pharmaka und auch Alkohol erwähnt.

Bei der Vielfalt der Wirkung und der weiten zum Teil unkontrollierbaren Verbreitung scheint es nicht verwunderlich, daß die Phenothiazine zum Gegenstand umfassender Untersuchungen in Pharmakologie und Toxikologie wurden.

3. Problemstellung und allgemeine Methodik.

Gegenstand der nachfolgend beschriebenen Untersuchungen waren Stoffwechselprodukte, die bei Körperpassage von Levomepromazin im Harn von Ratte und Mensch auftreten.

a. Kleine, therapeutisch wirksame Mengen Levomepromazinmaleinat wurden oral verabreicht und nach Resorption im Magen-Darmtrakt über Niere und Darm wieder ausgeschieden.
Levomepromazin = Neurocil^{R}, Nozinan, Neozine, 7044 R.P., Methotrimepazin.

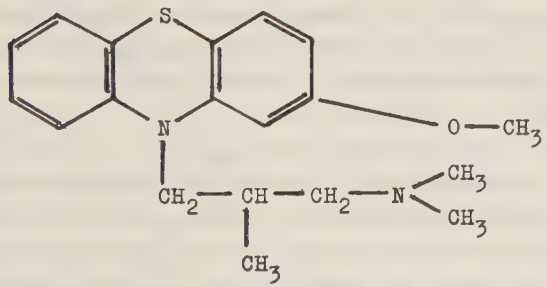


Abb. 3, N - (3'Dimethylamino - 2'- methyl - propyl) - - 3 - methoxyphenothiazin.

1. Physikalische Eigenschaften:
Schmelzpunkt: Maleinat: 182 - 184° C
Löslichkeit : Die freie Base des Levomepromazin ist gut lipoidlöslich, läßt sich jedoch in Wasser nur schlecht lösen.

2. Pharmakologische Wirksamkeit:
Sarwer-Foner (29) beschreiben Levomepromazin als ein starkes Neuroleptikum, das klinisch z.B. mit 1/2 bis 2/3 der bei Chlorpromazin üblichen Dosen wirksam ist, bei vergleichsweise geringerer Toxizität des Levomepromazins. Fast alle Patienten zeigten nach Applikation Müdigkeit, Schwäche und Schwindelgefühl, sowie Trockenheit des Mundes. Das Medikament erwies sich nützlich zur Unterstützung der Hypnose sowie bei der Behandlung von Schlaflosigkeit, Erregungs- Angst- und Reizzuständen.

b. Untersucht wurde zunächst Rattenurin, später der Harn von Menschen.
Als Versuchstiere dienten männliche Ratten (Stamm: Wista) mit einem Durchschnittsgewicht von 250 - 300 g. 50 mg Levomepromazin wurden in 10 ml Wasser suspendiert und mittels einer Sonde direkt in den Magen der Ratten eingeführt. Anschließend wurde der 24-Stunden-Harn gesammelt. Zu diesem Zweck wurden die Tiere in Stoffwechselkäfige (trichterförmige Behälter mit einem Boden aus Drahtgeflecht) gesetzt und der Urin aufgefangen.
Im Anschluß an die Untersuchungsreihe mit Rattenharn wurden vergleichende Versuche mit menschlichem Harn unternommen. Die Patienten bekamen ebenfalls 50 mg Levomepromazin oral verabreicht, der 24-Stunden-Harn wurde gesammelt und dem gleichen Untersuchungsgang unterworfen, wie der Rattenurin.

II Untersuchung von Rattenharn

1. Untersuchungsgang:

Levomepromazin ist als Base in Wasser schlecht löslich. Durch Veränderungen am Phenothiazin-Molekül bei der Metabolisierung in der Leber kann jedoch die Polarität und damit die Wasserlöslichkeit erhöht werden. Diesen Weg der Metabolisierung benutzt der Organismus, um Levomepromazin über die Niere ausscheiden zu können.

Für den Gang der Untersuchung war es notwendig, Levomepromazin und seine Metaboliten möglichst frei von Verunreinigungen isolieren zu können, d.h. ein geeignetes Extraktionsverfahren mußte gefunden werden.

War dies gelungen, sollten die funktionellen Gruppen der einzelnen Abbauprodukte mittels Dünnschichtchromatographie und UV-Spektrogrammen festgestellt werden. Daraus ergaben sich folgende Arbeitsgänge:

A Extraktion
B Chromatographie
a. Fließmittel
b. Sprühreagenzien
C UV-Spektren

A Extraktion:

Zunächst war es notwendig ein Lösungsmittel zu finden, das sich nicht oder nur sehr schwer mit Wasser mischt und trotzdem eine ausreichende Polarität aufweist, um die zu untersuchenden Metaboliten aufnehmen zu können. Bei dieser Suche nach einem Extraktionsverfahren mit genügender Extraktionsrate konnten wir uns auf die Tatsache stützen, daß die Phenothiazinderivate in ihrer Salzform gut wasserlöslich sind und sich in organischen Lösungsmitteln nur schlecht lösen, während für ihre freien Basen das Gegenteil gilt.

a. Saure Chloroformextraktion

Als besonders günstig erwies sich die von Kotionis (16) beschriebene saure Extraktionsmethode mit Chloroform, für die Lerbs (18-19) bei Harnextraktion von Levomepromazin-Reinsubstanz eine Extraktionsrate von 80 - 100 % angibt.

Das Verfahren beruht auf der besonders guten Chloroformlöslichkeit der Phenothiazinhydrochloride.

100 ml phenothiazinhaltiger Harn wurden mit Salzsäure auf pH = 1 angesäuert, d.h. die vorliegenden Phenothiazinabkömmlinge werden in die Hydrochlorid-Form übergeführt. Unter Zugabe von 25 ml Chloroform wurde der angesäuerte Harn 15 Minuten in einem Schütteltrichter ausgeschüttelt. Die dabei entstandene Emulsion mußte, um eine weitgehende Trennung der Chloroform- von der wässrigen Phase zu erreichen, 20 Minuten bei 4000 Umdrehungen/Minute zentrifugiert werden. Eine vollständige Trennung war nicht möglich, da zwischen beiden Phasen eine Schicht blieb, in der beide Mittel ineinander gelöst vorliegen. Der Extraktionsgang - Ausschütteln und Zentrifugieren - wurde anschließend noch zweimal wiederholt.

Wenn man annimmt, daß bei der ersten Extraktion nur 60 % der Phenothiazinhydrochloride extrahiert wurden und bei jeder weiteren Extraktion jeweils 60 % des Restes hinzukommen, so ergibt sich letztlich eine Gesamtextraktionsrate von 94 %.

Störender Nebeneffekt dieses Extraktionsverfahrens war die gleichzeitige Aufnahme saurer Harnsubstanzen in den Chloroformextrakt, die jedoch durch zweimaliges Waschen mit 25 ml n/10 Natronlauge beseitigt werden konnten. Dieser Reinigungseffekt wird durch eine zweifache Wirkung der Natronlauge ermöglicht:

Die Phenothiazin-Hydrochloride werden in die freien Basen überführt, wodurch sie in organischen Lösungsmitteln löslich gemacht werden, während gleichzeitig die sauren Harnsubstanzen in ihre gut wasserlöslichen Salze überführt werden.

Durch vorsichtiges Abgießen, so daß keine Reste der wässrigen Phase zurückbleiben konnten, wurde die gereinigte Chloroformphase von der n/10 NaOH getrennt, das Chloroform im Rotationsverdampfer abdestilliert und der Rückstand in 1 ml Methanol gelöst.

b. Saure Hydrolyse und Essigesterextraktion:
Nadeau und Sobolewski (23) berichten, daß 65,6 % ± 18,4 % der gesamten aus dem Urin extrahierten Levomepromazinmenge in konjugierter Form vorliege. Es wurde also notwendig, bei der Extraktion zwischen nichtkonjugierten und konjugierten Levomepromazin-Derivaten zu unterscheiden, die nicht mit ein und demselben Extraktionsverfahren dargestellt werden konnten. Die vergleichsweise höhere Polarität und deshalb bessere Wasserlöslichkeit der konjugierten Derivate macht ein zweites, nachfolgendes Extraktionsverfahren der Harn-

proben notwendig. Erst nach Entfernung der nichtkonjugierten Metaboliten mit der oben beschriebenen Chloroform-Extraktion wurden die konjugierten nach Hydrolyse in der salzsauren, wässrigen Phase freigesetzt. Nach Überführung des salzsauren - in ein schwach alkalisches Milieu mittels Ammoniak, konnten die nun in der Form ihrer freien Basen vorliegenden Ausscheidungsprodukte mittels Essigester extrahiert werden.

Um eine größtmögliche Extraktionsrate zu erzielen, wurde das Hydrolyseverfahren in Abhängigkeit von Zeit und p_H - Wert ausgetestet. Untersucht wurde die Extraktion bei einer Hydrolysedauer von 5, 15, 25, 35 Minuten, sowie den p_H - Werten 6, 3, 1, also schwach-, mittel- und stark sauer. Die größte Extraktionsrate ergab sich für die Extraktionsdauer von 25 Minuten in stark saurem Milieu bei $p_H = 1$.
Als Extraktionsmittel diente in diesem Fall Essigester, der innerhalb der elutropen Reihe zu den polarsten Lösungsmitteln zählt, das sich nicht oder nur geringfügig mit Wasser mischt und somit eine Extraktion ermöglicht.

Hydrolysegang: Die nach Abtrennung des Chloroforms zurückgebliebene wässrige, salzsaure Phase wurde 25 Minuten im Wasserbad erhitzt. Anschließend wurde mittels Ammoniak ein schwach alkalisches Milieu geschaffen und dreimal mit 20 ml Essigester ausgeschüttelt, jeweils zentrifugiert und mit n/10 Natronlauge gewaschen - wie bereits für das saure Extraktionsverfahren beschrieben.
Um einen Zersetzungseffekt des sauren Hydrolyseverfahrens (23) ausschließen zu können, wurde Levomepromazin-Reinsubstanz den gleichen Bedingungen un-

terworfen. Im nachfolgend angefertigten Dünnschichtchromatogram konnten keine Artefakte festgestellt werden.

B Dünnschicht - Chromatographie

Zur Isolierung der Levomepromazinderivate aus den oben beschriebenen Harnextrakten (Chloroform- und Essigesterextrakt) wurde die Dünnschichtchromatographie (Adsorptionschromatographie) verwendet.

Um die erhaltenen Ergebnisse exakt reproduzieren zu können, d.h. konstante, fehlerfreie Laufstrecken für jeden einzelnen Metaboliten zu erhalten, war es notwendig streng standardisierte Bedingungen zu schaffen. In diesem Zusammenhang sind verschiedene Faktoren zu beachten:

1. Die Laufstrecke einer Substanz im Dünnschichtchromatogram ist abhängig vom Sorptionsmittel, dem Lösungsmittel, sowie den spazifischen Eigenschaften der Substanz.

2. Um Abweichungen von der Laufstrecke unter "Normbedingungen" zu verhindern, ist es notwendig, daß die im Folgenden genannten Faktoren unveränderlich und gleichmäßig standardisiert sind:

   a. Aktivität der Adsorptionsschicht. Sie ist abhängig von der Qualität des Sorptionsmittels, den Aktivierungsbedingungen und der Luftfeuchtigkeit.

   b. Schichtdicke.

   c. Kammersättigung.

   d. Qualität des Fließmittels.

e. In bestimmten Grenzen die aufgetragene Menge des zu chromatographierenden Stoffes.

f. Temperatur des Raumes.

g. Begleitsubstanzen (Verunreinigungen)

Aus der Laufstrecke der chromatographierten Substanz und der Entfernung "Startpunkt zur Fließmittelfront" läßt sich der sogenannte Rf-Wert nach folgender Formel bestimmen:

$$\text{Rf-Wert} = \frac{\text{Laufstrecke der Substanz}}{\text{Laufstrecke des Fließmittels}}$$

Substanzen mit ähnlichem R_f - Wert können sich im Chromatogram überlagern, oder, wenn sie sich in der Verteilung zwischen mobiler und stationärer Phase gegenseitig beeinflussen - verdrängen.

Bei dieser Versuchsreihe wurde mit Kieselgel GF_{254} gearbeitet, das in dünner Schicht auf Glasplatten aufgetragen wird. Durch Kapillarkräfte wird das Aufsteigen des jeweiligen Fließmittels verursacht. Schütte (33) spricht von einer Chemisorption als Folgeerscheinung des schwach sauren Charakters der Kieselgelschicht und des basischen der Phenothiazine.

a. Fließmittel

Bei der Suche nach einem geeigneten Fließmittelsystem waren folgende Fakten zu berücksichtigen:

(1) Phenothiazine sind in der Form ihrer freien Basen relativ wenig polar.

(2) polare Lösungsmittel bewirken eine starke Elution, während die Elution bei unpolaren Lösungsmitteln geringer ist.

Die R_f - Werte der wenig polaren Phenothiazinbasen stehen also in unmittelbarem Verhältnis zur Polarität des benutzten Fließmittels, d.h. die R_f - Werte steigen mit der Polarität des Fließmittels. Ausgetestet wurden die bei Lerbs (18-19) und Norden (26-27) verwendeten Fließmittelkombinationen.

Mit der von Lerbs (18-19) beschriebenen Fließmittelkombination:
Pyridin: Petroläther: Methanol im Mischungsverhältnis 1 : 4, 5 : 0, 1 war keine einwandfreie Trennung der Metaboliten möglich. Bei R_f = 0,5 zeigte sich ein einzelner Metabolit, während im R_f - Bereich 0 - 0,2 eine Reihe von Metaboliten mit fließenden Übergängen dargestellt werden konnten. Eine Trennung mit Identifizierung der Metaboliten war damit nicht möglich.

Die bei Norden (26-27) beschriebene Fließmittelkombination:
Dimethylformamid: Essigester im Mischungsverhältnis 1 : 3 ermöglichte eine bessere Trennung der Metaboliten, die durch kleine Änderungen im Mischungsverhältnis noch verbessert werden konnte. Aus verschiedenen Testversuchen zeigte sich, daß für die Schaffung eines Standardmetabolitenbildes mit optimaler Trennung der einzelnen Metaboliten das Mischungsverhältnis 2,5 : 9 am geeignetsten ist.

Die im "Standardmetabolitenbild" dargestellten Metaboliten erwiesen sich als nicht "rein" genug für die Anfertigung von UV-Spektren. Deshalb wurde eine "Metabolitenreinigung" durch Chromatographie der eluier-

ten "Standardmetaboliten" angestrebt. Verwendet wurde dieselbe Fließmittelkombination, deren Mischungsverhältnis entsprechend abgewandelt wurde. Mit dem Fließmittel Dimethylformamid: Essigester im Mischungsverhältnis 1 : 9 gelang eine gute Trennung der weniger polaren Metaboliten, während die stärker polaren Metaboliten einen Rf-Bereich von 0 - 0,2 nicht überschritten und wegen der Überlagerung eine Trennung mit Identifizierung nicht möglich war. Mit dem Fließmittel Dimethylformamid: Essigester im Mischungsverhältnis 2 : 3 gelang eine gute Trennung der stärker polaren Metaboliten, während die weniger polaren Metaboliten auf einen engen Rf-Bereich zusammengedrängt lagen, so daß eine Trennung mit Identifizierung nicht möglich war.

b. Sprühreagenzien

1. Denkbare Metabolisierungsorte ($M_{1-2-3-4}$) und funktionelle Gruppen nach dem Stand der Forschung:

Metabolisierungsort 1 (M_1) ist der Ring-Schwefel,
Metabolisierungsort 2 (M_2) die aliphatische Aminogruppe,
Metabolisierungsort 3 (M_3) die Methoxygruppe,
Metabolisierungsort 4 (M_4) der nicht-substituierte Benzolring.

(s. Abbildung Nr. 4 Formel 1)

M_1 Oxydation am Ring-Schwefel:

Schon 1956 wiesen Brodie und Salzmann (8) Chlorpromazinsulfoxyd im Harn von Patienten und Hunden nach. R.T. Williams (38) beschreibt die Oxydationsmöglichkeit des Ring-Schwefel zum Sulfoxyd und Sulfon. Allgen u.a. (2) wiesen Methoxypromazinsulfoxyd als wichtigstes Abbau-

produkt des Methoxypromazin nach.
(s. Abbildung Nr. 5 Formel 2 und 3)

M_2 Oxydative N-Demethylierung:

In der Literatur wird die Demethylierung von Alkylaminen als oxydativer Prozeß beschrieben, der von relativ unspezifischen Enzymsystemen der Leber ermöglicht wird. Als Endprodukte entstehen dabei Formaldehyd und Amine B.N.La Du u.a. (17); S.C. Mueller u.a. (22); M.C. Lindbergh (21); D.M. Ziegler u.a. (41).
Eine Reihe von Arbeiten, speziell über die Demethylierung von Phenothiazinen liegen vor von V. Fishman u.a. (10-11); R.T. Young u.a. (39-40); S.S. Walkenstein u.a. (36).
(s. Abbildung Nr. 4 Formel 4 und 5)

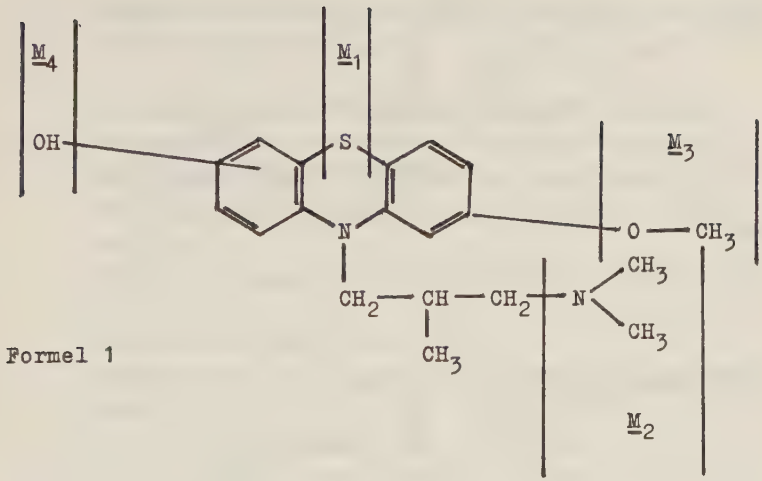
M_3 Oxydative O-Demethylierung:

Die Spaltung aromatischer Ätherverbindungen im Organismus ist bereits seit einer Reihe von Jahren bekannt. Huggins u.a. (14); Axelrod u.a. (3-4); J.N. Smith (34); T.K. Adler u.a. (1); Bray u.a. (6); Netter u.a. (25); Axelrod (4) stellte 1956 fest, daß in der Leber ein Enzymsystem existiert, das aromatische Äther in Phenole und Aldehyde, in unserem Fall Formaldehyd, spaltet. Es muß sich dabei um eine relativ unspezifische Dealkylase handeln, da alle untersuchten aromatischen Äther gespalten wurden. Breuer u.a. (7) berichten in diesem Zusammenhang über Methoxyöstrogene, die durch eine unspezifische Demethylase zu 2-Hydroxyöstrogen demethyliert wurde.
(s. Abbildung Nr. 4 Formel 6)

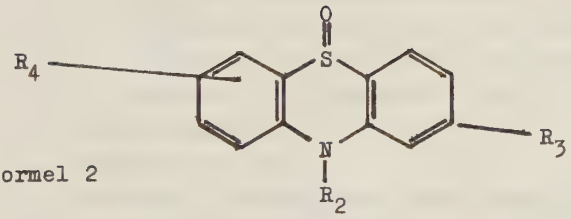
M_4 Hydroxylierung am Aromaten:

R.T. Williams (38) beschreibt die Möglichkeit der Hydroxylierung an beiden aromatischen Ringen der Phenothiazin-Reinsubstanz und des Sulfoxids in para-Stellung zum Ring-N und in meta--Stellung zum Ring-S.
T.H. Lin u.a. (20) wiesen auf die Existenz von Glucuroniden bei einer vorausgegangenen Hydroxylierung am Ring hin. Mittels Kationenaustauscher und Papierchromatographie konnten vier Konjugate des Chlorpromazin nachgewiesen werden. Die Autoren sind der Meinung, daß die Anwesenheit phenolischer OH-Gruppen zur Konjugation mit Glucuronsäure führt und daß die Hydroxylierung einen wesentlichen Bestandteil der Metabolisierung darstellt. Posner (28) fand drei phenolische Metaboliten, die er als 3-Hydroxy oder 4,7-Di-Hydroxy - Derivate des Chlorpromazin oder deren Sulfoxyde angab.
Bei V. Fishman u.a. (11) wird eine Gruppe von vier phenolischen Metaboliten sowohl in freier als in konjugierter Form nachgewiesen: 7-Hydroxy-Chlorpromazin; 7-Hydroxy-Chlorpromazinsulfoxyd, sowie deren mono- und bisdemethylierten Derivate.
Becket u.a. (5) beschreiben mono- und bisdemethylierte Derivate des Chlorpromazin, die im Anschluß an die Demethylierung hydroxyliert und weiter mit Glucuronsäure hauptsächlich konjugiert werden. N-Didesmethyl-Chlorpromazin-Monoglucuronid wurde als bedeutendster Metabolit identifiziert.

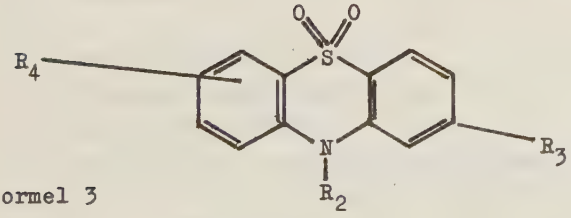
(s. Abbildung Nr. 4 Formel 7)



Formel 1

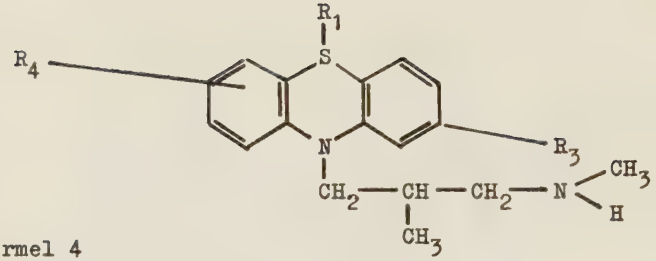


Formel 2

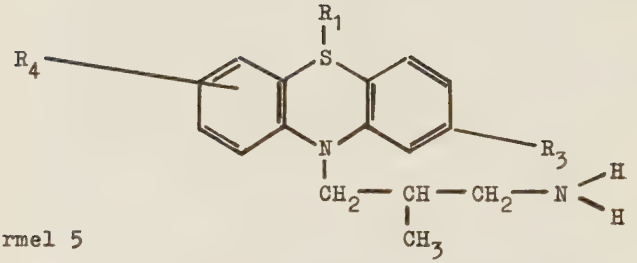


Formel 3

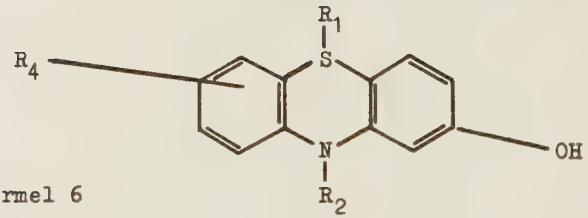
Abb. 4 Denkbare Metabolisierungsorte ($M_{1-2-3-4}$) des Levomepromazin und funktionelle Gruppen. Formel 1-3.



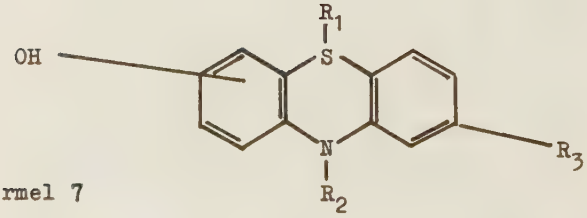
Formel 4



Formel 5



Formel 6



Formel 7

Abb. 4 Denkbare Metabolisierungsorte ($M_{1-2-3-4}$) des Levomepromazin und funktionelle Gruppen. Formel 4-7.

2. Spezifische Sprühreagenzien zum Nachweis der "funktionellen Gruppen"

Zur Anfärbung der Abbauprodukte und Identifizierung der einzelnen Metabolisierungsorte wurden Sprühreagenzien verwendet, die spezifische Reaktionen mit den vorliegenden funktionellen Gruppen zeigten.
Zur Anwendung gelangten folgende Sprühreagenzien:

Metabolisierungsort M_1:
Sprühreagenz S_1: konzentrierte HCl mit einer Spur $NaNO_2$ (13).
S_2: 50 % H_2SO_4 (8)
S_3: 1 % $FeCl_3$-Lösung in 2,5 n - HNO_3 (9)
S_4: MBTH: 0,3 % wässrige Lösung;
Nachbehandlung mit 0,6 % $FeCl_3$-Lösung
(MBTH = 3 - Methyl - 2 - benzothiazolon - hydrazon - Hydrochlorid) (30-32)
Sulfide reagieren mit allen unter S_1-S_4 genannten Sprühreagenzien.
Sulfoxyde reagieren mit allen, außer dem unter "S_3" genannten Sprühreagenz.
Sulfone reagieren nur mit dem unter "S_4" genannten Sprühreagenz (5).

Metabolisierungsort M_2:
Die nachfolgenden Sprühreagenzien wurden zur Identifizierung verwendet:
S_5: Ninhydrin: 0,1 % Lösung in Butanol (35)
S_6: Natriumnitroprussid: 2 % Lösung in wässrigem Acetaldehyd.
Nachbehandlung mit 2 % Natriumkarbonat-Lösung (35)
Sprühreagenz "S_5" dient zum Nachweis primärer und sekundärer Amine.

Sprühreagenz "S_6" reagiert nur bei sekundären Aminen positiv.

Metabolisierungsorte M_3 und M_4:
Veränderungen an diesen Molekülpunkten konnten im Rahmen der gegebenen Möglichkeiten nur mittels UV-Spektren festgestellt werden.

C UV - Spektren

Um UV-Spektren der einzelnen Metaboliten anfertigen zu können, war es zunächst notwendig, die Metaboliten mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie isoliert darzustellen. Als Fließmittel diente für die "polaren" Metaboliten das System Dimethylformamid: Essigester im Mischungsverhältnis 2 : 3; für die "weniger polaren" Metaboliten das System : Dimethylformamid : Essigester im Mischungsverhältnis 1 : 9. Von der so gewonnenen jeweiligen Metabolitenreinsubstanz wurden zwei UV-Spektren angefertigt. Zu diesem Zweck wurde die Substanz

1. in Methanol gelöst
2. die in Methanol gelöste Substanz wurde mit einem Tropfen Natronlauge versetzt.

Die Anwesenheit freier OH-Gruppen im Phenothiazinmolekül führt bei den in alkalischem Milieu angefertigten Spektren - vergleichsweise zu den in nichtalkalischem Milieu angefertigten - zu einer Verschiebung der Maxima nach längeren Wellenbereichen.

2. Anfertigung eines Metabolitenbildes ("Standardmetabolitenbild")

Um ein genaues Metabolitenbild anfertigen zu können, mußte a. ein geeignetes Fließmittelsystem (s. Seite 9)

b. ein für Phenothiazine spezifisches Sprühreagenz gefunden werden.

Zu b. Da im Leerharn nur saure Harnsubstanzen enthalten sind, Phenothiazine und ihre Derivate jedoch basischen Charakter haben, war es notwendig, ein Sprühreagenz zu finden, das nur mit chromatographierten basischen Substanzen reagiert. Dieser Forderung entsprach das bei Norden (26,27) beschriebene Sprühreagenz Jodplateat, das sich zu gleichen Volum-Teilen aus 0,3 %-iger Platin-IV-chlorwasserstoffsäure und 6 %-iger Kaliumjodlösung zusammensetzt. Alle Substanzflecken des Metabolitenbildes zeigten violette Anfärbung und waren lediglich durch Farbnuancen unterschieden, die zwischen rot- und blauviolett lagen.

Das Metabolitenbild:

Die Metaboliten I, II und III liegen sehr dicht zusammen und gehen nahezu ineinander über. Mit Jodplateat besprüht, unterscheiden sie sich nur durch leichte Farbnuancen. Die Intensität der Farbreaktionen ist bei den Metaboliten I und V besonders stark, beim Metaboliten IV besonders schwach. Die Form der Flecke im Chromatogram ist gedrungen; nur der Metabolit V zeigt eine Schwanzbildung.

Die Metaboliten IV, V, VI, VII, VIII und IX sind eindeutig und klar voneinander getrennt.

Der Metabolit VI tritt nur nach Hydrolyse im Essigesterextrakt in Erscheinung.

Die Abbildung 5 Seite 19 zeigt eine graphische Darstellung des Metabolitenbildes.

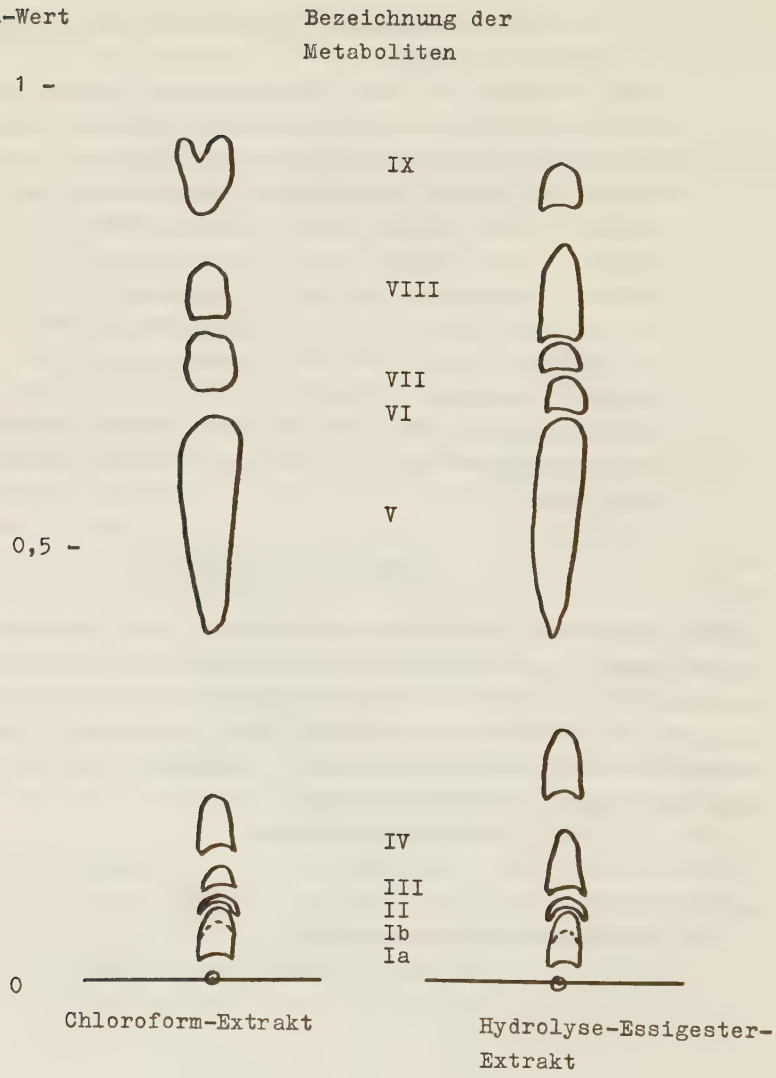


Abb. 5 "Standardmetabolitenbild"

Identifizierung der Metaboliten anhand von

A Sprühreagenzien
B Vergleichsubstanzen
C UV-Spektren

A Sprühreagenzien:

S_1 konzentrierte HCl + Spur $NaNO_2$
S_2 50 %-ige H_2SO_4
S_3 (1 %-ige $FeCl_3 . 6 H_2O$) - Lösung in HNO_3 (2,5 - N).
S_4 0,35 %-ige wässrige MBTH-Lösung (s. Seite 16) nachfolgend 0,6 %-ige $FeCl_3$-Lösung.
S_5 0,1 %-ige Ninhydrin-Lösung in n-Butanol. Nachbehandlung: 3 Minuten im Trockenschrank bei ca. 100° C erhitzen.
S_6 2 %-ige Natriumnitroprussid-Lösung in 10 %-iger wässriger Acetaldehyd-Lösung.

a) Allgemeine Untersuchungen:

1. Farbreaktionen verschiedener Phenothiazinderivate mit den Sprühreagenzien S_1 - S_3

Levomepromazin-Reinsubstanz:

Sprühreagenz S_1: Stark rot-violette Farbreaktion
Sprühreagenz S_2: Rot-violette Farbreaktion
Sprühreagenz S_3: Violette Farbreaktion.

Synthetisiertes Levomepromazin-Sulfoxyd:

Sprühreagenz S_1: Dunkel blau - violette, abblassende Farbreaktion.
Sprühreagenz S_2: Rot - violette, stark nachdunkelnde Farbreaktion.
Sprühreagenz S_3: Keine Farbreaktion.

Chlorpromazin-Sulfoxyd:

Sprühreagenz S_1: Blass - rote, abblassende Farbreaktion.
Sprühreagenz S_2: Konzentriert dunkelrote, stark nachdunkelnde Farbreaktion.
Sprühreagenz S_3: Keine Farbreaktion.

2. Um die Farbreaktion eines Phenothiazin-Sulfons mit dem Sprühreagenz "S_4" kennenzulernen, wurde Oxomemazin (Imakol) besprüht. Es zeigte sich eine dunkelblaue Farbreaktion.

3. Um die Empfindlichkeit der Sprühreagenzien "S_5" und "S_6" kennenzulernen, wurden eine Reihe primärer und sekundärer Amine besprüht.

Primäre Amine:

Benzedrin (ß - Phenylisopropylamin)
Corbasil (3 - (o - Dihydroxyphenyl) propanolamin)
Novadral (1 - (m - Hydroxyphenyl) aminoäthanol)

Sekundäre Amine:

Veritol (1 - (4 - Hydroxyphenyl) -2-methyl-aminopropan).
Effortil (1 - (3 - Hydroxyphenyl) -1-hydroxy -2- äthylaminoäthan.
Ephedrin (1 - Phenyl -2- methylaminopropanol).

Besprühung mit Reagenz "S_5" zeigte sofort bei allen primären und sekundären Aminen positive Farbreaktionen, die zwischen leuchtend hell - rot und violett variierten.

Mit Sprühreagenz "S_6" zeigten die primären Amine keine Reaktion. Die sekundären Amine Veritol und Effortil waren sofort stark und weniger stark blau gefärbt, während Ephedrin erst nach Erhitzen hellblaue Farbreaktion zeigte.

Bei allen unter 1, 2 und 3 beschriebenen Testversuchen wurden die zu untersuchenden Substanzen zunächst mit Ammoniak in die Form ihrer freien Basen gebracht (siehe Seite 28), bevor sie auf Kieselgelplatten aufgetragen wurden.

b) Farbreaktionen der einzelnen Metaboliten des Harnextraktes mit den oben benannten Sprühreagenzien:

Metabolit I: zeigt mit den oben angegebenen Sprühreagenzien folgende Reaktionen:

Sprühreagenz S_1: Im Augenblick des Aufsprühens ist das obere Metabolitendrittel (d.h. das der Fließmittelfront am nächsten gelegene) dunkel rotbraun, die unteren zwei Drittel (= dem Startpunkt am nächsten gelegenen) dunkelblauviolett angefärbt.
Beide Metabolitenbereiche tendieren zu einer raschen, einheitlichen Verfärbung nach dunkel blau-grau. Trotz mehrfacher Variation der Fließmittelkombination gelang es nicht, diesen Komplex zu trennen.

Sprühreagenz S_2: Einheitliche blau-violette Anfärbung.

Sprühreagenz S_3: Zunächst keine Reaktion. Nach einiger Zeit entwickelt sich im unteren Metabolitenanteil eine schwach anthrazitfarbene Farbreaktion.

Sprühreagenz S_4: Der obere Metabolitenbereich zeigt keine Farbreaktion. Dunkel blaugraue Farbreaktion im unteren Metabolitenbereich.

Sprühreagenz S_5: Orange-rote Anfärbung.

Sprühreagenz S_6: Grün-graue Anfärbung.

Diskussion der Farbreaktionen des Metaboliten I:

Die unterschiedlichen Farbreaktionen des unteren, wie des oberen Metabolitenanteils lassen es sehr wahrscheinlich erscheinen, daß hier eine Überschneidung mindestens zweier Metaboliten vorliegt. Aus den Farbreaktionen mit den Sprühreagenzien S_3 und S_4 ist zu entnehmen, daß es sich bei dem unteren Metabolitenanteil um ein Sulfon - bei dem oberen Metabolitenanteil um ein Sulfoxid handelt. Die Farbreaktionen S_5 und S_6 zeigen das Vorhandensein eines sekundären Amins an.

Metabolit II: zeigt mit den oben angegebenen Sprühreagenzien folgende Farbreaktionen:

Sprühreagenz S_1: Zunächst grell-blaue Verfärbung, die dann nach einiger Zeit einen Farbwandel nach blau-grün mit überwiegend grünem Farbton erfährt.

Sprühreagenz S_2: Grell-blaue Verfärbung.

Sprühreagenz S_3: Zunächst rot-violette Farbreaktion; nach einiger Zeit erfolgte ein Farbumschlag nach grell-rot.

Sprühreagenz S_4: Dunkel-blaue Verfärbung.

Sprühreagenz S_5: Schwach-rote Farbreaktion.

Sprühreagenz S_6: Keine Farbreaktion.

Diskussion der Farbreaktionen des Metaboliten II:

Die Farbreaktionen dieses Metaboliten heben sich deutlich von denen der anderen Metaboliten, ausgenommen Metabolit VII, ab. Die Anfärbungen weisen auf die Existenz eines Sulfids und einer primären Aminogruppe hin.
I.S. Forrest u.a. (13) sowie M. Kaufmann (15) beschreiben sog. "Radikale" des Chlorpromazin, die sich in ihren Farbreaktionen deutlich von den übrigen Metaboliten unterscheiden. Der Beweis, daß es sich bei Metabolit II um ein solches "Radikal" des Levomepromazin handelt, konnte jedoch nicht erbracht werden.

Metabolit III: zeigt mit den oben angegebenen Sprühreagenzien folgende Farbreaktionen:

Sprühreagenz S_1: Rot-violette Farbreaktion.

Sprühreagenz S_2: Blau-violette Farbreaktion.

Sprühreagenz S_3: Rot-violette Farbreaktion.

Sprühreagenz S_4: Blaue Farbreaktion.

Sprühreagenz S_5: Orange-rote Farbreaktion.

Sprühreagenz S_6: Grün-graue Farbreaktion.

Diskussion der Farbreaktionen des Metaboliten III:

Die Farbreaktionen weisen darauf hin, daß es sich bei diesem Metaboliten um ein Sulfid und sekundäres Amin handelt.

Metabolit IV: zeigt mit den oben genannten Sprühreagenzien folgende Farbreaktionen:

Sprühreagenz S_1: Rot-violette Farbreaktion.

Sprühreagenz S_2: Blau-violette Farbreaktion.

Sprühreagenz S_3: Rot-violette Farbreaktion.

Sprühreagenz S_4: Rot-violette Farbreaktion.

Sprühreagenz S_5: Orange_rote Farbreaktion.

Sprühreagenz S_6: Grün-graue Farbreaktion.

Diskussion der Farbreaktionen des Metaboliten IV:

Die Farbreaktionen der Metaboliten III und IV stimmen außer mit dem Sprühreagenz "S_4" völlig überein. Die Konzentration der Farbreaktionen des Metaboliten IV ist gegenüber denen des Metaboliten III erheblich schwächer. Auch bei diesem Metaboliten handelt es sich wahrscheinlich um ein Sulfid und sekundäres Amin.

Metabolit V: zeigt mit den oben genannten Sprühreagenzien folgende Farbreaktionen:

Sprühreagenz S_1: Stark blau-violette Farbreaktion.

Sprühreagenz S_2: Rot-violette Farbreaktion, die nach einiger Zeit stark nachdunkelt.

Sprühreagenz S_3 bis S_6: keine Reaktion.

Diskussion der Farbreaktionen des Metaboliten V:

Aus den beschriebenen Farbreaktionen ist zu ersehen, daß es sich bei diesem Metaboliten um ein Sulfoxid und tertiäres Amin handelt.

Metabolit VI: zeigt mit den oben genannten Sprühreagenzien folgende Farbreaktionen:

Sprühreagenz S_1: Stark rot-violette Farbreaktion.

Sprühreagenz S_2: Stark rot-violette Farbreaktion.

Sprühreagenz S_3: Stark violette Farbreaktion.

Sprühreagenz S_4: Stark violette Farbreaktion.

Sprühreagenz S_5: Keine Reaktion.

Sprühreagenz S_6: Keine Reaktion.

Diskussion der Farbreaktionen des Metaboliten VI:

Die Farbreaktionen weisen auf das Vorliegen eines Sulfids und tertiären Amins hin.

Metabolit VII: zeigt mit den oben genannten Sprühreagenzien folgende Farbreaktionen:

Sprühreagenz S_1: Zunächst grell-blaue Verfärbung, die dann nach einiger Zeit einen Farbwechsel nach blau-grün mit überwiegend grünem Farbton erfährt.

Sprühreagenz S_2: Grell-blaue Verfärbung.

Sprühreagenz S_3: Zunächst rot-violette Farbreaktion; nach einiger Zeit erfolgt ein Farbumschlag nach grell-rot.

Sprühreagenz S_4: Dunkel-blaue Farbreaktion.

Sprühreagenz S_5: Keine Farbreaktion.

Sprühreagenz S_6: Keine Farbreaktion.

Diskussion der Farbreaktionen des Metaboliten VII:

Diese Farbreaktionen entsprechen denen des Metaboliten II vollständig. Auch sie heben sich deutlich von denen des übrigen Metabolitenbildes ab. Den Anfärbungen entsprechend kann es sich um ein Sulfid und tertiäres Amin handeln.
(s. auch Diskussion der Farbreaktionen des Metaboliten II).

Metabolit VIII: zeigt mit den oben genannten Sprühreagenzien folgende Farbreaktionen:

Sprühreagenz S_1: Stark blau-violette Farbreaktion.

Sprühreagenz S_2: Stark rot-violette Farbreaktion.

Sprühreagenz S_3: Violette Farbreaktion.

Sprühreagenz S_4: Hell-blaue Farbreaktion.

Sprühreagenz S_5: Keine Farbreaktion.

Sprühreagenz S_6: Keine Farbreaktion.

Diskussion der Farbreaktionen des Metaboliten VIII:

Aus den oben beschriebenen Farbreaktionen ist zu entnehmen, daß es sich bei dem Metaboliten VIII um ein Sulfid und tertiäres Amin handelt.

Metabolit IX: zeigt mit den oben genannten Sprühreagenzien folgende Farbreaktionen:

Sprühreagenz S_1: Stark rot-violette Farbreaktion.

Sprühreagenz S_2: Rot-violette Farbreaktion.

Sprühreagenz S_3: Violette Farbreaktion.

Sprühreagenz S_4: Hell-blaue Farbreaktion.

Sprühreagenz S_5: Keine Farbreaktion.

Sprühreagenz S_6: Keine Farbreaktion.

Diskussion der Farbreaktionen des Metaboliten IX:

Die Farbreaktionen entsprechen fast vollständig denen des Metaboliten VIII. Sie bedeuten, daß hier ein Sulfid und tertiäres Amin vorliegt. Der Metabolit verhält sich chromatographisch völlig wie Levomepromazin.

c) Tabellarische Zusammenfassung der Farbreaktionen (an den Metabolisierungsorten M_1 und M_2):

Metabolisierungsort M_1: Die Metabolisierung an diesem Molekülpunkt wurde mit den Sprühreagenzien S_1, S_2, S_3 und S_4 getestet.

Metabolisierungsort M_2: Um eventuelle Strukturveränderungen an diesem Molekülpunkt nachweisen zu können, wurden die Sprühreagenzien S_5 und S_6 verwendet.

Tabelle Nr. 1 zeigt die Reaktionsmöglichkeit der einzelnen Sprühreagenzien bei den entsprechend möglichen Strukturveränderungen.

Tabelle Nr. 2 zeigt die Reaktion des einzelnen Metaboliten mit dem jeweiligen Sprühreagenz.

Zeichenerklärung:

+ = positive Reaktion
- = negative Reaktion
Ø = keine Reaktion erwartet
⊖ = nicht einzuordnende Reaktionen

Tabelle Nr. 1

Sprühreagenzien:	S_1	S_2	S_3	S_4	S_5	S_6	
	+	+	+	+	Ø	Ø	Sulfide
	+	+		+	Ø	Ø	Sulfoxyd
	-	-	-	+	Ø	Ø	Sulfon
	Ø	Ø	Ø	Ø	+	-	prim. Amine
	Ø	Ø	Ø	Ø	+	+	sek. Amine

Tabelle Nr. 2

Sprühreagenzien:	S_1	S_2	S_3	S_4	S_5	S_6	
Metaboliten: Ia	+	+	(+)	+	+	+	- sek. Amin-Sulfon.
Ib	+	+	-	-	+	+	- Sulfoxyd; -sek. Amin.
II	⊖	⊖	⊖	⊖	+	-	- nicht einzuordnendes prim. Amin und Sulfid.
III	+	+	+	+	+	+	- Sulfid; sek. Amin.
IV	+	+	+	+	+	+	- Sulfid; sek. Amin.
V	+	+	-	-	-	-	- Sulfoxyd tert. Amin.
VI	+	+	+	+	-	-	- Sulfid; tert. Amin.
VII	⊖	⊖	⊖	⊖	+	-	- s. Metabolit II tert, Amin.
VIII	+	+	+	+	-	-	- Sulfid; tert. Amin
IX	+	+	+	+	-	-	- Sulfid; tert. Amin

Identifizierung der Metaboliten mittels:

B Vergleichssubstanzen

1, Vergleichsweise wurde die freie Base der Levomepromazin-Reinsubstanz mit dem Chloroform- und Hydrolyseextrakt chromatographiert.
Der Rf-Wert der freien Base, sowie die Farbreaktionen mit den früher besprochenen Sprühreagenzien, ergaben eine vollständige Übereinstimmung mit dem Metaboliten IX, so daß eine Identität anzunehmen ist. Der endgültige Beweis soll durch das UV-Spektrum erbracht werden.

Herstellen der freien Base:
Wie bereits früher berichtet, ist Levomepromazin in seiner Salzform gut wasserlöslich. Eine wässrige Lösung von Levomepromazinmaleinat wird ammoniakalisch gemacht und die so dargestellte freie Base in Äther ausgeschüttelt. Anschließend wird der Äther im Rotationsverdampfer abdestilliert und der Rückstand in wenig Methanol aufgenommen.

2. Weygand und Hilgetag (37) sowie Algen u.a. (2) berichten über die Herstellung von Sulfoxyden und Sulfonen.
Ihre Methode wurde zur Darstellung von Levomepromazin-Sulfoxyd- und -Sulfon übernommen. Zu diesem Zweck wurde 1 mMol Levomepromazin-Reinsubstanz (= 44,4 mg) mit 1 mMol Wasserstoffsuperoxyd (= 0,34 ml 1 % H_2O_2) versetzt und nach Zugabe von Eisessig zwei Stunden im Wasserbad erhitzt. Anschließend wurde mit Chloroform extrahiert und der Extrakt chromatographiert.

Im Chromatogramm konnten drei Reaktionsprodukte X, Y und Z isoliert dargestellt werden.

M X Das Reaktionsprodukt X zeigte mit Sprühreagenz "S_4" eine dunkelblaue Farbreaktion. Becket (5) bezeichnet dieses Sprühreagenz "S_4" als spezifisch für Sulfone. Zu Testzwecken wurde das Phenothiazin-Sulfon Imakol (Oxomemazin) mit Reagenz "S_4" besprüht. Vergleiche der erhaltenen Farbreaktionen machten es sehr wahrscheinlich, daß es sich bei MX um Levomepromazin-Sulfon handelt. Lage und Farbreaktion des synthetisierten Reaktionsproduktes X mit dem Sprühreagenz "S_4" entsprachen dem Metabolitenanteil Ia des Harnextraktes.

M Y Die Farbreaktionen dieses Reaktionsproduktes mit den Sprühreagenzien S_2-S_4 entsprachen denen, wie man sie bei einem Sulfoxyd erwartet. MY stellt also ein synthetisiertes Levomepromazin-Sulfoxyd dar.
Nach Lage und Farbreaktionen entsprach das synthetisierte Reaktionsprodukt Y dem Metaboliten V des Harnextraktes. Die Annahme, daß der Metabolit V des Harnextraktes Levomepromazin-Sulfoxyd sei, wurde damit bestätigt.

M Z Das Reaktionsprodukt Z entsprach in Lage und Farbreaktionen der chromatographierten Levomepromazin-Reinsubstanz, kann also als "nicht oxydierte Ausgangssubstanz" unseres Syntheseversuches angesehen werden. Diesem Reaktionsprodukt Z entsprach im Harnextrakt der Metabolit IX. Damit wurde die Annahme bestätigt, daß es sich bei Metabolit IX um vom Körper unverändert ausgeschiedenes Levomepromazin handelt.

Identifizierung der Metaboliten anhand von:

C UV-Spektren

a. UV-Spektren von Vergleichssubstanzen.

Um die Spektrentypen der einzelnen Metaboliten feststellen zu können, wurden die bei Becket (5) beschriebenen UV-Spektren zu Vergleichen herangezogen. Darüberhinaus war es notwendig, UV-Spektren von verschiedenen Vergleichssubstanzen, wie dem synthetisierten Levomepromazin-Sulfoxyd (s.S.21), dem Sulfon Oxomemazin (Imakol), sowie folgenden weiteren Substanzen * anzufertigen: Chlorpromazin, Chlorpromazin-Sulfoxyd, Desmethylchlorpromazin, 2-Hydroxypromazin, 2-Methoxypromazin und Promazin.

Anhand der zum Vergleich vorliegenden UV-Spektren konnten die Maxima typischer Sulfid- Sulfoxid- und Sulfonspektren festgestellt werden:

Sulfid:	253 nm Maximum
	305 nm Maximum
Sulfoxid:	250 nm Maximum
	275 nm Maximum
	295 nm Maximum
Sulfon:	239, 5 nm Maximum
	251 nm Maximum
	270 nm Maximum
	292 nm Maximum

---

* An dieser Stelle möchte ich der Fa. - Societes des Usines Chimiques Rhone-Pulenc, P.O.Box 753-08, Paris, France - für die freundliche Übersendung der oben benannten Substanzen danken.

O-Desmethyl: 251 nm Maximum Verschiebung
255 nm Maximum
302 nm Maximum Verschiebung
309 nm Maximum

b. UV-Spektren der einzelnen Metaboliten.

Um Metabolitenspektren anfertigen zu können, war es zunächst notwendig, die einzelnen Metaboliten aus dem Dünnschichtchromatogramm (Fließmittel, Dimethylformamid : Essigester = 2,5 : 9) herauszukratzen, mit Methanol zu eluieren und erneut mit einem zweiten Fließmittel zu chromatographieren, um eine weitere Reinigung der Metaboliten zu erreichen. Eine gute Trennung der einzelnen Metaboliten des Rf-Bereiches Rf = o - Rf = 0,4 wurde durch erneute Chromatographie mit dem Fließmittelsystem Dimethylformamid : Essigester = 2 : 3 erreicht.

Die Rf-Bereiche über Rf = 0,4 wurden durch erneute Chromatographie mit dem Fließmittelsystem DMF : Es = 1 : 9 getrennt und damit gereinigt. Die nunmehr von einander getrennten Metaboliten wurden mit Methanol eluiert und das Methanol abdestilliert.

Von der somit gewonnenen Metabolitenreinsubstanz wurden anschließend jeweils 2 UV-Spektren angefertigt:

Die Substanz wurde:
1. in Methanol gelöst
2. die in Methanol gelöste Substanz wurde mit einem Tropfen NaOH versetzt.

Die Anwesenheit freier OH-Gruppen im Molekül führt bei den Spektren in alkalischem Milieu - beim Ver-

gleich mit den in nicht - alkalischem Milieu angefertigten Spektren zu einer Verschiebung der Maxima nach längeren Wellenbereichen.

METABOLIT Ia: 240 nm Schulter
253 nm Maximum
274 nm Maximum
295 nm Maximum
Eine Verschiebung der Maxima im alkalischen Milieu lag nicht vor.

Diskussion: Kein reines UV-Spektrum eines Sulfons. Es spricht jedoch auch nicht gegen die Existenz eines Sulfons. Wahrscheinlich Überlagerung von Sulfon und Sulfoxid.

METABOLIT Ib: 251 nm Maximum
274 nm Maximum
295 nm Maximum
Keine Verschiebung der Maxima in alkalischem Milieu.

Diskussion: Die Maxima dieses Spektrums entsprechen denen eines typischen Sulfoxid-Spektrums.

METABOLIT II : Ergab keine auswertbaren UV-Spektren.

METABOLIT III : 250 nm Maximum
(275 nm Maximum) ?
294 nm Maximum
Keine Verschiebung der Maxima in alkalischem Milieu.

Diskussion: Die Maxima entsprechen einem schwachen Sulfid - Spektrum.

METABOLIT IV : Ergab keine auswertbaren Spektren.

METABOLIT V : 250 nm Maximum
274 nm Maximum
295 nm Maximum
Keine Verschiebung der Maxima in alkalischem Milieu.

Diskussion: Die Maxima dieses Spektrums entsprechen denen eines sehr typischen Sulfoxid-Spektrums.

METABOLIT VI :

	Verschiebung:
241 nm Maximum	257 nm Maximum
(252 nm Schulter)	----------
(265 nm Schulter)	(285 nm Schulter)
300 nm Maximum	311 nm Maximum

Verschiebung der Maxima in alkalischem Milieu s.re.o.

Diskussion: Die Maxima dieses Spektrums entsprechen denen eines Sulfid-Spektrums.
Wie vergleichend festgestellt werden konnte, sind diese Maxima nicht identisch mit denen einer O-Desmethyl-Verbindung (es wurden UV - Spektren von 3-Hydroxypromazin angefertigt; außerdem die bei Becket (5) beschriebenen Spektren vergleichsweise herangezogen.)

Wie bereits vorher beschrieben, beruht die Verschiebung der Maxima in alkalischem Milieu auf der Anwesenheit freier OH-Gruppen im Molekül. Da die Verschiebung der Maxima sehr stark ist, ist wahrscheinlich, daß sie von zwei freien, im Molekül enthaltenen OH-Gruppen verursacht wird. Bei diesem Metaboliten handelt es sich außer um ein Hydroxylierungsprodukt eventuell sogar um eine hydroxylierte O-Desmethylverbindung des Levomepromazin.

METABOLIT VII : Ergab keine auswertbaren UV-Spektren.

METABOLIT VIII :

	Verschiebung:
243 nm Maximum	252 nm Maximum
298 nm Maximum	312 nm Maximum

Verschiebung der Maxima in alkalischem Milieu s. re.o.

Diskussion: Die Maxima dieses Spektrums entsprechen denen eines Sulfid-Spektrums; sie sind nicht identisch mit denen einer O-Desmethylverbindung.
Die beim Vergleich mit dem Metaboliten VI geringere Verschiebung der Maxima in alkalischem Milieu - macht sehr wahrscheinlich, daß es sich bei diesem Metaboliten um ein Hydroxylierungsprodukt des Levomepromazin mit nur einer OH-Gruppe handelt.

METABOLIT IX : 254 nm Maximum
298 nm Maximum
Keine Verschiebung der Maxima
in alkalischem Milieu.

Diskussion: Die Maxima entsprechen denen eines schwachen Sulfid - Spektrums.

4. Zusammenfassung der Ergebnisse.

a. Funktionelle Gruppen an den Metabolisierungsorten M_1 - M_4.

Wie auf Seite 12 beschrieben, zeigt die Strukturformel des Levomepromazin vier denkbare Metabolisierungsorte (M_1 - M_4; s. Abb. Nr. 4/6, Formel Nr. 1). Eine Identifizierung der Strukturverhältnisse an diesen Metabolisierungsorten gelang mittels der Dünnschichtchromatographie (nach Wahl geeigneter Sprühreagenzien) und auf Grund von UV-Spektren.

Metabolit Ia : M_1 = Sulfon
M_2 = Sekundäres Amin
M_3 = Methoxygruppe
M_4 = Keine Hydroxylierung

(s. Abb. 6 Formel Nr. 2)

Metabolit Ib : M_1 = Sulfoxid
M_2 = Sekundäres Amin
M_3 = Methoxygruppe
M_4 = Keine Hydroxylierung

(s. Abb. 6 Formel Nr. 3)

Metabolit II : Farbreaktionen zeigten sich mit den spezifischen Sprühreagenzien für Sulfide (M_1) und primäre Amine (M_2). Da die erhaltenen Farbreaktionen jedoch extrem verschieden von dem sonstigen Metabolitenbild (ausgenommen Metabolit VII) ausfielen, war naheliegend anzunehmen,

daß es sich hier möglicherweise um ein "Radikal" (13,15) des Levomepromazin handelt. Der exakte Beweis dieser Annahme konnte im Rahmen der gegebenen Möglichkeiten nicht erbracht werden.

Auswertbare UV-Spektrogramme konnten nicht angefertigt werden.

Anhand der erhaltenen Ergebnisse war eine Identifizierung der Metabolitenstruktur nicht möglich.

Metabolit III : M_1 = Sulfid
M_2 = Sekundäres Amin
M_3 = Methoxygruppe
M_4 = Keine Hydroxylierung

(s. Abb. 6 Formel Nr. 4)

Metabolit IV : M_1 = Sulfid
M_2 = Sekundäres Amin
M_3 = Keine Angaben möglich
M_4 = Keine Angaben möglich

(Da keine auswertbaren UV-Spektren angefertigt werden konnten, war eine genaue Aussage über die Anwesenheit freier OH-Gruppen im Metabolitenmolekül nicht möglich).

(s. Abb. 6 Formel Nr. 5)

Metabolit V : M_1 = Sulfoxid
M_2 = Tertiäres Amin
M_3 = Methoxygruppe
M_4 = Keine Hydroxylierung

(s. Abb. 6 Formel Nr. 6)

Metabolit VI : M_1 = Sulfid
M_2 = Tertiäres Amin
M_3 = Hydroxylgruppe
M_4 = Hydroxylgruppe

(s. Abb. 6 Formel Nr. 7)

Metabolit VII : Farbreaktionen zeigten sich mit den spezifischen Sprühreagenzien für Sulfide (M_1) und tertiäre Amine (M_2). Da die erhaltenen Farbreaktionen jedoch extrem verschieden von dem sonstigen Metabolitenbild (ausgenommen Metabolit II) ausfielen, war naheliegend anzunehmen, daß es sich hier möglicherweise um ein "Radikal" (13,15) des Levomepromazin handelt. Der exakte Beweis dieser Annahme konnte im Rahmen der gegebenen Möglichkeiten nicht erbracht werden.

Auswertbare UV-Spektrogramme konnten nicht angefertigt werden.

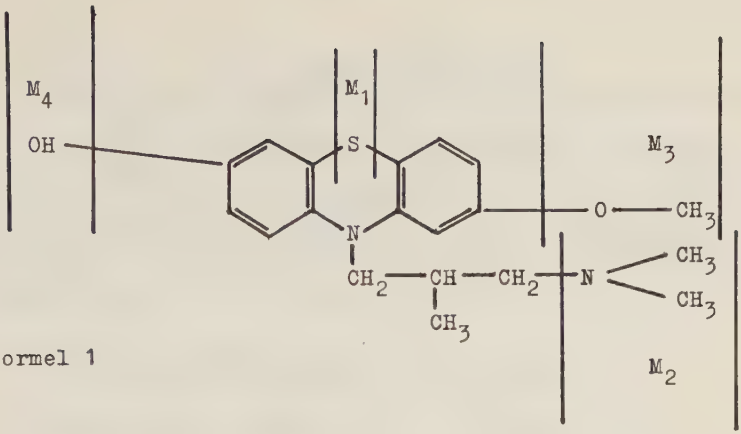
Anhand der erhaltenen Ergebnisse war eine Identifizierung der Metabolitenstruktur nicht möglich.

Metabolit VIII : M_1 = Sulfid
M_2 = Tertiäres Amin
M_3 = Methoxygruppe
M_4 = Hydroxylgruppe

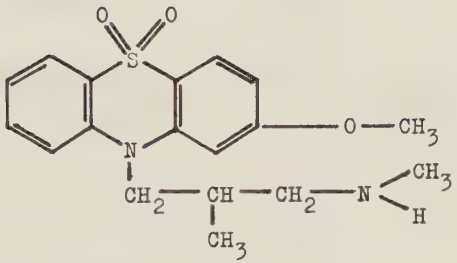
(s. Abb. 6 Formel Nr. 8)

Metabolit IX : M_1 = Sulfid
M_2 = Tertiäres Amin
M_3 = Methoxygruppe
M_4 = Keine Hydroxylierung

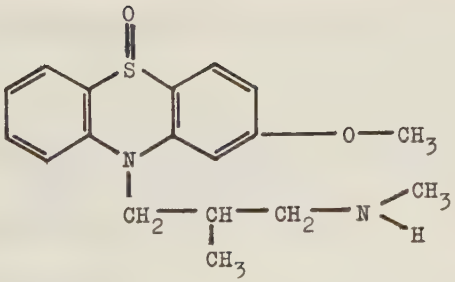
(s. Abb. 6 Formel Nr. 9)



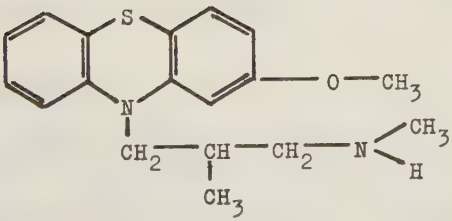
Formel 1



Formel 2

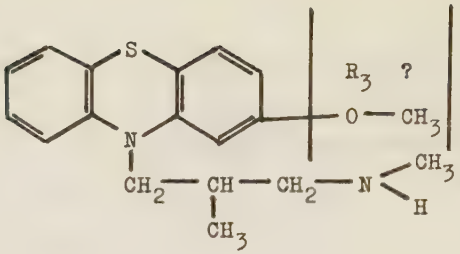


Formel 3

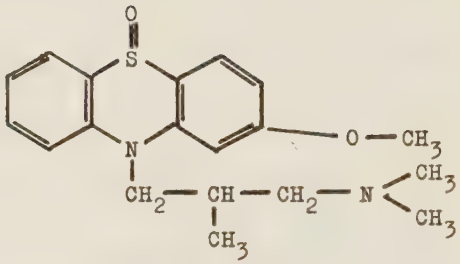


Formel 4

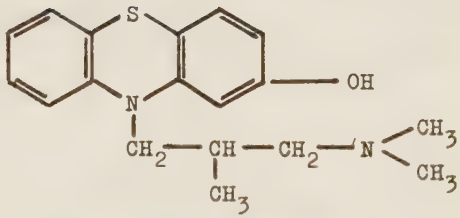
Abb. 6 Strukturformeln der Metaboliten



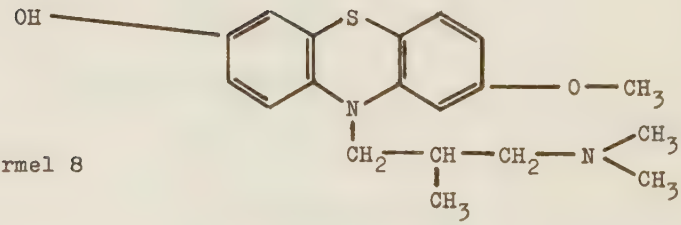
Formel 5



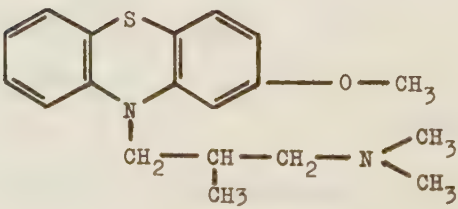
Formel 6



Formel 7



Formel 8



Formel 9

III Vergleichende Untersuchungen von Patientenharn

Nach oraler Applikation von 50 mg Levomepromazin wurde der 24-Stunden-Harn von Patienten gesammelt und dem gleichen Untersuchungsgang unterworfen, wie bei der Untersuchung des Rattenurins beschrieben. Extrahiert wurden jeweils 100 ml Leerharn bzw. 100 ml Levomepromazinharn.

1. Patienten-Leerharnextrakt:

a) Chloroformextrakt:

Im nicht besprühten Dünnschichtchromatogramm zeigten sich von Start bis Fließmittelfront feine braune Streifen mitextrahierter Harnsubstanzen, die dicht unter der Fließmittelfront in breitere dunkelbraune Farbflecken mit verschiedenen Farbeinlagerungen übergehen. Trotz mehrfachen Waschens mit n/10 NaOH konnte eine völlige "Reinigung" nicht erreicht werden.

b) Hydrolyse mit anschließender Essigesterextraktion:

Im nicht besprühten Dünnschichtchromatogramm zeigen sich vom Start zur Fließmittelfront an Breite und Konzentration zunehmende rot-violette Streifen. Auch hier, wie beim Chloroformextrakt, war eine völlige Reinigung mit n/10 Natronlauge nicht möglich.

2. Patienten-Levomepromazinharnextrakt:

a) Chloroformextrakt:

Im Dünnschichtchromatogramm zeigten sich 6 Metaboliten, die in Lage und Farbreaktionen mit den früher beschriebenen Sprühreagenzien, den Meta-

boliten I, V, VII, VIII und IX des Rattenharnextraktes entsprachen.

b) Hydrolyse mit anschließender Essigesterextraktion:

Im Dünnschichtchromatogramm zeigten sich 7 Metaboliten, die in Lage und Farbreaktion den Metaboliten I, III, IV, V, VI und VII des Rattenharnextraktes entsprachen.

Diskussion der Ergebnisse:

Die großen Mengen des zu extrahierenden Patientenharns brachten es mit sich, daß mehr saure Harnsubstanzen mitextrahiert wurden als bei den vergleichsweise sehr geringen Rattenharnmengen (deren Harnextrakte von den wenigen mitextrahierten sauren Harnsubstanzen gut gereinigt werden konnten).

Um eine ausreichende Reinigung der Patientenharnextrakte zu erreichen, mußte mehrmals mit n/10 Natronlauge gewaschen werden. Die dabei auftretenden Verluste an Metabolitensubstanz machten eine völlige Reinigung jedoch unmöglich.

IV Tabellarischer Vergleich der aus Ratten- und Menschenharnextrakten erhaltenen Metabolitenbilder:

Ratte:		Mensch:	
Chloroform-extrakt	Essigester-extrakt	Chloroform-extrakt	Essigester-extrakt
I	I	I	I
II	II	-	-
III	III	-	III
IV	IV	IV	IV
V	V	V	V
-	VI	VI	VI
VII	VII	VII	VII
VIII	VIII	VIII	-
IX	IX	IX	-

Tabelle 3 Tabelle 4

Der Vergleich der Dünnschichtchromatogramme von Menschen- und Rattenharnextrakten zeigt das völlige Fehlen des Metaboliten II im Menschenharnextrakt, sowie unterschiedliche Extraktion bei den Metaboliten III, VI, VIII und IX.

Ansonsten zeigten die Metaboliten des Ratten- und Menschenharnextraktes im Dünnschichtchromatogramm völlige Übereinstimmung in Lage und Farbreaktion mit den früher beschriebenen Sprühreagenzien.

Während für das Fehlen des Metaboliten II im Menschenharnextrakt eine unterschiedliche Metabolisierung bei Ratte und Mensch angenommen werden kann, ist die unterschiedliche Extraktion der Metaboliten III, VI, VIII und IX wahrscheinlich auf unterschiedliche Bindungsverhältnisse (d.h. Ver-

esterung mit Glukuronsäure oder Schwefelsäure) bei der Metabolisierung in der Leber und Ausscheidung über die Niere zurückzuführen.

Im Rahmen der gegebenen Möglichkeiten war nur eine Diskussion der unterschiedlichen Metabolitenextraktion aus Ratten- und Patientenharn möglich. Genaure Untersuchungen sollten Gegenstand weiterführender Arbeiten sein.

ZUSAMMENFASSUNG :

In der vorliegenden Arbeit wurde der Abbau von N- (3' Dimethylamino - 2' - methyl - propyl) - 3 - methoxyphenothiazin (Levomepromazin) im Organismus untersucht.

Nach Körperpassage oral applizierter Levomepromazins wurde der 24-Std.-Harn von Ratten und Patienten einer sauren Extraktion mit Chloroform und einer sauren Hydrolyse mit anschließender Essigesterextraktion unterzogen. Die in den beiden Extrakten enthaltenen Abbauprodukte des Levomepromazins wurden mittels Dünnschichtchromatographie dargestellt. Verwendet wurde Kieselgel GF_{254}. Als Fließmittel mit der besten Metabolitentrennung im Chromatogramm erwies sich die Kombination Dimethylformamid : Essigester. Günstig für die Identifizierung der Levomepromazinderivate war die Tatsache, daß im Harn normalerweise nur saure Substanzen existieren, die zu untersuchenden Metaboliten jedoch basischen Charakter besitzen und so - mittels Jodplateat als "spezifischem Reagens für basische Stoffe" - nachgewiesen werden konnten. Durch die Wahl spezifischer und genügend empfindlicher Sprühreagenzien gelang es, die funktionellen Gruppen der einzelnen Metaboliten zu identifizieren.

Im "Standardmetabolitenbild" zeigten sich neun Metaboliten, deren Strukturverhältnisse mit Hilfe spezifischer Sprühreagenzien, anhand von Vergleichssubstanzen (Chlorpromazin, Chlorpromazin-Sulfoxyd, 2-Hydroxypromazin, 2-Methoxypromazin, Promazin, - Oxomemazin- und Levomepromazin-Sulfoxyd), sowie durch Auswertung und Vergleich von UV-Spektren geklärt werden konnten.

Wegen ihrer besonderen Farbreaktionen aus dem Metabolitenbild hervorstechend, seien die Metaboliten II und VII

erwähnt. Eine Identifizierung dieser Metaboliten war nicht möglich.

Wegen ihrer Menge und konzentrierten Farbreaktionen besonders auffällig, sind die als Sulfoxyde des Levomepromazin identifizierten Metaboliten I und V.
Die Substanz IX wurde als unverändert ausgeschiedene Levomepromazin-Reinsubstanz erkannt.

VI Literaturverzeichnis

1. Adler T.K. and Latham M.E.
Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.) 73, 401 (1950).

2. Algen L.G., Jönson B., Rappe A. und Dahlom P.
Experientia 15, 318 - 319 (1959).

3. Axelrod J. and Brodie B.B.
J. Pharmacol.exp.Ther. 97, 49 (1957).

4. Axelrod J.
J. Biochem. 63, 643 (1956).

5. Beckett A.H., Beaven M.A. and Robinson A.E.
Biochemical Pharmacology 12, 779 - 794 (1963).

6. Bray H.G., Rao P.N. und Goldzieher J.W.
Arch. Biochem. 94, 256 (1961).

7. Breuer H., Knuppen M., Gross D. und Rittmayer C.
Acta Endocrinologica 46 (3), 361 - 378 (1964).

8. Brodie B.B. and Salzman N.P.
J. Pharm.and exp.Ther. 46, 118 (1956).

9. Fishman V. and Goldberg G.
Proc.Soc.exp.Biol.N.Y. 104, 99 (1960).

10. Fishman V. and Goldberg G.
Proc.Soc.exp.Biol.N.Y. 108, 178 (1961).

11. Fishman V. and Goldberg G.
Proc.Soc.exp.Biol.N.Y. 112, 501 - 506 (1963).

12. Flanagan T.L., Lin T.H., Novack W.J., Rondish I.M., Bocher C.A. and Van Loon E.J.
J. med. pharm. Chem. 1, 263 (1959).

13. Forrest I.S., Forrest F.M. and Berger M.
Biochemica et Biophysica Acta 29, 441 (1958).

14. Huggins C.H., Jensen E.V. and Cleveland A.S.
Proc.Soc.exp.Biol.N.Y. 68, 477 (1948).

15. Kaufman M. and Fels I.G.
Nature London 183, 1392 (1959).

16. Kotionis A.Z.
Arzneimittelforschung 11, 108 (1961).

17. La Du B.N., Gaudette L., Trousof N. and Brodie B.B.
J. of Biol. Chem. 214, 741 (1955).

18. Lerbs O.W.
Inaugural-Dissertation, Tübingen 1963.

19. Lerbs O.W., Eberhardt H. und Freundt K.J.
Arzneimittelforschung 13, 804 - 805 (1963).

20. Lin T.H., Reynolds L.W., Rondish I.M. and Van Loon E.J.
Proc.Soc.exp.Biol.N.Y. 102, 602 (1959).

21. Lindbergh M.C.
Dissert.Abstr. 23 (8); 2682 - 2683 (1963).

22. Mueller S.C. and Miller I.A.
J.Biol.Chem. 202, 579 (1953).

23. Nadeau G. and Sobolewski G.
Canad.Med.Ass. J.Oct.15 81, 658-659 (1959).

24. Nadeau G. and Sobolewski G.
Canad.Med.Ass. J. 80, 826 - 827 (1959).

25. Netter K.J. und Seidel G.
J. Pharmacol.exp.Ther. 146 (1), 64-65 (1964).

26. Norden O.
Inaugural-Dissertation,Tübingen 1963.

27. Norden O. und Eberhardt H.
Arzneimittelforschung 14, 1354 - 1355 (1964).

28. Posner H.S.
Abstract of paper presented to the American Chemical Society 135th Meeting 81 e (1959).

29. Sarwer-Foner G.J., Hajinsek F., Groszman M.,
Grauer H. and Koramyi E.K.
Canad.Serv.Med.Jour. 17 (11), 789 - 817 (1961).

30. Sawicki E., Hauser T.R., Stanley T.W. and Elbert W.
Analyt.Chem. 33, 93 (1961).

31. Sawicki E., Hauser T.R., Stanley T.W. and Elbert W.
Analyt.Chem. 33, 722 (1961).

32. Sawicki E., Hauser T.R., Stanley T.W. and Elbert W.
Analyt.Chem. 33, 1574 (1961).

33. Schütte J.
Dissertation. Institut für gerichtliche Med.
FU Berlin 1956.

34. Smith J.N. and Williams R.T.
Biochem. J. 44, 239 (1949).

35. Sweeley C.C. and Hroning E.C.
J. Amer. chem. Soc. 79, 2620 (1957).

36. Walkenstein S.S. and Seifter J.
J. Pharmacol. 125, 283 (1958).

37. Weygand K. und Hilgetag G.
Experimentierkunst S. 715 - 716
(Barth, Leipziger Bücherkathalog 1964).

38. Williams R.T.
Detoxication Mechanism S. 546
(2. Aufl. London: Chapman and Hall LTD 1959).

39. Young R.L., Ross J.J. and Maas A.R.
Nature London 183, 1396 (1959).

40. Young R.L., Ross J.J. and Maas A.R.
Scienci 128, 1279 (1958).

41. Ziegler D.M., Krueger H. and Pettit F.
Federation Prox. 22 (2pt 1), 366 (1963).

L E B E N S L A U F

Am 23. Februar 1941 wurde ich, Jürgen-Rüdiger P e t z e l als Sohn des Pfarrers Günther Petzel und seiner Ehefrau Elfriede, geb. Strunk in Cumlosen Kreis West-Prignitz/Brandenburg geboren.

Nach Besuch der Grundschulen in Cumlosen und Wittenberge/Brandenburg absolvierte ich die Oberrealschule mit Gymnasium in Nördlingen/Bayern, wo ich im Juli 1960 die Reifeprüfung ablegte.

Mein Medizinstudium nahm ich im Wintersemester 1960/61 an der Universität Tübingen auf. Hier legte ich im Herbst 1963 die ärztliche Vorprüfung ab und begann im Frühjahr 1967 mit dem medizinischen Staatsexamen, das ich jedoch, um die Folgen eines Autounfalles kurieren zu können, für mehrere Monate unterbrechen mußte. Nach vollständig bestandenem Staatsexamen im Februar 1968 konnte ich meine Tätigkeit als Medizinalassistent beginnen.